

ref. 9

世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 A61K 45/00, 38/00, 39/395, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P 35/00, 43/00, C12Q 1/68, G01N 33/60, 33/15, 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO00/62809 (43) 国際公開日 2000年10月26日(26.10.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02544 (22) 国際出願日 2000年4月19日(19.04.00) (30) 優先権データ 特願平11/111026 1999年4月19日(19.04.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 田中 亨(TANAKA, Akira)[JP/JP] 〒329-0434 栃木県河内郡南河内町祇園3-1-3-D-303 Tochigi, (JP)	(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: PROLIFERATION INHIBITOR FOR ANDROGEN-INDEPENDENT TUMOR (54) 発明の名称 アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤 (57) Abstract A proliferation inhibitor for androgen-independent tumor; remedies and diagnostics for androgen-independent tumor; a method for the diagnosis of androgen-independent tumor; and a method for screening a substance inhibiting the proliferation of androgen-independent tumor cells.		

(57)要約

本発明は、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤、アンドロゲン非依存性腫瘍の治療薬および診断薬、アンドロゲン非依存性腫瘍の診断方法、ならびにアンドロゲン非依存性腫瘍細胞の増殖抑制物質のスクリーニング方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ			NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ			NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス			NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ			PL	ポーランド		
DE	ドイツ			PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		
		KR	韓国				

明 細 書

アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤

技術分野

本発明は、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤、アンドロゲン非依存性腫瘍の治療薬および診断薬、アンドロゲン非依存性腫瘍の診断方法、ならびにアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

前立腺癌は、欧米の成人男子の悪性腫瘍の死亡率では第2位、日本においても年々増加しており、頻度の高い疾患といえる〔赤座英之、癌と化学療法、23、401（1996）〕。前立腺癌は、アンドロゲン依存性という特殊な生物学的特性を有することで知られている。そのため、前立腺癌患者の治療方法としては、抗アンドロゲン療法が治療の主体をなしており、該療法が前立腺癌患者の80～90%の症例に奏効する。

しかし、抗アンドロゲン療法の最大の問題点は、患者に対し、抗アンドロゲン療法を継続していくと、いずれ該療法が無効になることである。多くの場合、抗アンドロゲン療法を開始した後、数ヶ月から数年で患者はアンドロゲン非依存性となり、いったんアンドロゲン非依存性に陥ると、6～18ヶ月で癌死に至る。

アンドロゲン非依存性腫瘍（再燃癌ともいう）の有効な治療法はなく、有効な治療法が強く望まれている〔赤座英之、癌と化学療法、23、401（1996）；平尾佳彦、癌と化学療法、23、418（1996）〕。また、アンドロゲン依存性腫瘍かアンドロゲン非依存性腫瘍かを適確に診断する方法、およびアンドロゲン依存性より非依存性への変化をモニターする診断方法も強く望まれている。

アンドロゲン依存性腫瘍からアンドロゲン非依存性腫瘍が誘導されるメカニズムはほとんど解明されていないが、以下に示すモデル実験系を利用した解析が試みられている。

マウス乳癌である Shionogi carcinoma 115 は、生理的な濃度のアンドロゲン存在下で、アンドロゲン依存性に増殖が見られることから、ホルモン依存性の乳癌および前立腺癌の実験モデルとして好適である〔Koga, M. et al., Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 54, 1（1995）〕。Shionogi carcinoma 115 腫瘍由来のアンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3 より、線維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor 以下、FGF と略記する）ファミリーの増殖因子である FGF-8 が単離され、FGF-8 はアンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3 のオートクライ

ン増殖因子であることが明らかとなった [Tanaka, A. et al., Proceeding of National Academy of Science USA, 89, 8928 (1992)]。オートクライン増殖因子とは、増殖因子を産生する細胞自身に作用する物質である。抗 FGF-8 抗体を用いた臨床組織標本の免疫組織染色により、ヒト前立腺癌組織には高率に FGF-8 が検出されることから、FGF-8 はホルモン依存的なヒト前立腺癌への関与が示唆されている [Tanaka, A. et al., Cancer Research, 58, 2053 (1998)]。アンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 Shionogi carcinoma 115 からアンドロゲンを除去することにより、アンドロゲン非依存性腫瘍を生じることが報告されている [Kitamura, Y. et al., Cancer Research, 39, 4713 (1979)]。さらに、該アンドロゲン非依存性腫瘍からマウス乳癌細胞 CAD021 [Noguchi, S. et al., Journal of Steroid Biochemistry, 32, 479 (1989)] およびアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 [Nonomura, N., et al., Cancer Research, 48, 4904 (1988)] が樹立されている。しかしながら、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 の産生する増殖因子については解明されていない。

以上のように、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖に関与する増殖因子については、解明されておらず、アンドロゲン非依存性腫瘍に有効な診断および治療方法は確立されていない。

アクチピンは、脳下垂体に働く卵胞刺激ホルモン FSH 分泌促進因子として発見された [Vale, W., et al., Nature, 231, 776 (1986)]。アクチピンは 14 キロダルトンのアクチピン β サブユニットのダイマーよりなり、タンパク質の一次構造上の類似性から TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子である。アクチピン β サブユニットには βA および βB の 2 種類が存在しているが、3 種類のダイマー $\beta A\beta A$ 、 $\beta B\beta B$ 、 $\beta A\beta B$ が報告され、それぞれアクチピン A ($\beta A\beta A$)、アクチピン B ($\beta B\beta B$)、アクチピン AB ($\beta A\beta B$) と命名されている [Vale, W., et al., Peptide growth factors and their receptors II, Editor Sporn, M.B. & Roberts, A.B., Springer 社刊 (1990)]。

これまでにアクチピンの機能としては、脳下垂体 FSH 分泌促進、赤芽球分化誘導、骨形成、神経細胞の維持、インスリン生産促進作用等が報告されている [Vale, W., et al., Peptide growth factors and their receptors II, Editor Sporn, M.B. & Roberts, A.B., Springer 社刊 (1990)] が、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖促進作用は知ら

れていない。

フォリスタチンは、哺乳動物の卵巣より単離された F S H 分泌抑制因子である [Ueno, N. et al., Proceeding of National Academy of Science USA, 84, 8282 (1987)]。フォリスタチンはアクチビンに結合性を示し [Nakamura, T., et al., Science, 247, 836 (1990)]、アクチビン活性を中和する作用を示すことが報告されている [Kogawa, K., et al., Endocrinology, 128, 1434 (1991)]。しかしながら、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制作用を有することについては、知られていない。

発明の開示

アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖に関与する増殖因子の同定および当該増殖を抑制するアンドロゲン非依存性腫瘍増殖抑制剤、ならびに、アンドロゲン非依存性腫瘍に有効な診断薬および治療薬が求められている。また、アンドロゲン依存性腫瘍ならびに非依存性腫瘍を適確に診断する方法、アンドロゲン依存性細胞よりアンドロゲン非依存性細胞への変化をモニターする診断方法が望まれている。

本発明者らは、アンドロゲン依存性マウス乳癌細胞より誘導されたアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 が、繊維芽細胞 NIH3T3 およびアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 細胞の増殖を促進する増殖因子であるアクチビンを産生すること、3 種のアクチビン (アクチビン A : $\beta A \beta A$, アクチビン B : $\beta B \beta B$, アクチビン AB : $\beta A \beta B$) の中で、とくにアクチビン B およびアクチビン A とアクチビン B との混合物がアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 細胞の増殖を促進すること、およびアクチビン阻害剤であるフォリスタチンがアンドロゲン非依存性乳癌細胞の産生する増殖促進活性物質を阻害することからフォリスタチンがアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤となることを見出し、本発明を完成させた。

さらに、本発明者らは、アンドロゲン依存性腫瘍のオートクライン増殖因子として知られていた FGF-8 が、アンドロゲン依存性腫瘍だけでなくアンドロゲン非依存性腫瘍に対しても増殖促進作用を示すこと、さらにアクチビンが FGF-8 と協同してアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖促進作用を有することなども見出し、本発明を完成させた。本発明は、アンドロゲン非依存性癌細胞の増殖抑制剤およびアンドロゲン非依存性腫瘍の診断または治療に関する。即ち本発明は以下の (1) ~ (27) に関する。

- (1) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質を有効成分として含有する、

アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。

アンドロゲン非依存性腫瘍としては、具体的には、前立腺癌、乳癌などがあげられる。

(2) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、アクチビン阻害活性を有する物質および線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質から選ばれる少なくとも1種である、上記(1)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。

アクチビン阻害活性を有する物質としては、アクチビンによるアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖促進を阻害できるものであればいかなるものでもよい。具体的には、アクチビン中和抗体 [DePaolo, L. V., et al., *Endocrinology*, 130, 1741 (1991)]、アクチビン受容体中和抗体、フォリスタチン [Nakamura, T., et al., *Science*, 247, 836 (1990); Kogawa, K., et al., *Endocrinology*, 128, 1434 (1991)] 等のアクチビン結合蛋白質、アクチビンのアンチセンス RNA/DNA [Demura R, et al., *Endocrine Journal*, 43, 403 (1996)]、アクチビンの発現を阻害することができる低分子、アクチビンに結合してアクチビンの機能を阻害する低分子、アクチビンのアンタゴニストおよび、それらの誘導体等があげられる。好ましくは、フォリスタチンがあげられる。

FGF-8 阻害活性を有する物質としては、抗 FGF-8 中和抗体 [特開平 9-271391; Tanaka, A. et al., *Cancer Research*, 58, 2053 (1998)]、抗 FGF-8 受容体中和抗体、FGF-8 のアンチセンス RNA/DNA、FGF-8 結合蛋白質、FGF-8 の発現を阻害することができる低分子、FGF-8 に結合して FGF-8 の機能を阻害する低分子、FGF-8 のアンタゴニストおよび、それらの誘導体等があげられる。好ましくは、抗 FGF-8 中和抗体、より好ましくは、抗 FGF-8 中和抗体 KM1334 (FERM BP-5451) があげられる。

上述のアクチビン阻害活性を有する物質および FGF-8 阻害活性を有する物質は、単独でもアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制するが、アクチビン阻害活性を有する物質と FGF-8 阻害活性を有する物質とを併用すれば、より効果的にアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制することができる。

(3) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、アクチビン阻害活性を有する物質である、上記(1)または(2)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。

(4) アクチビン阻害活性を有する物質が、抗アクチビン中和抗体、抗アクチビン受容体中和抗体、アクチビン結合蛋白質およびアクチビンのアンチセンス DNA/RNA から選ばれる物質である、上記(2)または(3)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。

(5) アクチビン結合蛋白質が、フォリスタチンである、上記(4)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。

(6) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質である、上記(1)または(2)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。

(7) 線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質が、抗 FGF-8 中和抗体である、上記(2)または(6)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。

(8) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質を有効成分として含有する、アンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

(9) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、アクチビン阻害活性を有する物質および線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質から選ばれる少なくとも1種である、上記(8)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

(10) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、アクチビン阻害活性を有する物質である、上記(8)または(9)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

(11) アクチビン阻害活性を有する物質が、抗アクチビン中和抗体、抗アクチビン受容体中和抗体、アクチビン結合蛋白質およびアクチビンのアンチセンス DNA/RNA から選ばれる物質である、上記(9)または(10)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

(12) アクチビン結合蛋白質が、フォリスタチンである、上記(11)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

(13) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質である、上記(8)または(9)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

(14) 線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質が、抗 FGF-8 中和抗体、抗 FGF-8 受容体中和抗体および FGF-8 アンチセンス DNA/RNA から選ばれる物質である、上記(7)または(13)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

(15) 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質およびアクチビン DNA/RNA から選ばれる物質を用いる、アクチビンの検出方法。

(16) アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、上記 (15) 記載のアクチビンの検出方法。

(17) 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質およびアクチビン DNA/RNA から選ばれる物質を用いる、アクチビンの定量方法。

(18) アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、上記 (16) 記載のアクチビンの定量方法。

(19) 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質、アクチビン DNA/RNA、抗 FGF-8 抗体および FGF-8 DNA/RNA から選ばれる物質を用いる、アンドロゲン非依存性腫瘍の診断方法。

(20) アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、上記 (19) 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の診断方法。

(21) 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質、アクチビン DNA/RNA、抗 FGF-8 抗体および FGF-8 DNA/RNA から選ばれる物質を用いる、アンドロゲン依存性細胞からアンドロゲン非依存性細胞への転換の診断方法。

(22) アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、上記 (21) 記載の診断方法。

(23) 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質、アクチビン DNA/RNA、抗 FGF-8 抗体および FGF-8 DNA/RNA から選ばれる物質を有効成分として含有する、アンドロゲン非依存性腫瘍診断薬。

(24) アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、上記 (23) 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍診断薬。

(25) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質を用いた、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制物質のスクリーニング方法。

本発明で見出されたアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖因子を用いて、アンドロゲン非依存性腫瘍細胞の増殖促進活性を阻害する物質のスクリーニングを行うことができる。アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖因子の好適なものとしては、アクチビン、FGF-8 等をあげることができる。

スクリーニング方法としては、後述する MTT 法、³H-TdR 取り込み法などがあげられる。該方法により、アンドロゲン非依存性細胞の増殖を阻害する薬剤をスクリーニン

グすることができる。スクリーニングにより取得される物質は、アンドロゲン非依存性腫瘍細胞の治療薬として有用である。

(26) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質がアクチビンである、上記(25)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制物質のスクリーニング方法。

(27) アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質が線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) である、上記(25)記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制物質のスクリーニング方法。

1. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質の単離および精製

アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質は以下に示す方法により単離することができる。

アンドロゲン非依存性腫瘍としては、アンドロゲン依存性細胞より誘導された、アンドロゲン非依存性に増殖可能な細胞であればいかなるものでもよい。具体的には、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021、アンドロゲン非依存性ヒト前立腺癌細胞 DU145 (ATCC HTB-81)、PC3 (ATCC CRL-1435) 等があげられる。

アンドロゲン非依存性腫瘍の産生するアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質は、腫瘍細胞を適当な培地中で培養することにより得られる培養液、あるいは、細胞の破砕液より取得することができる。

アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質の単離・精製は、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、遠心分離、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。アンドロゲン非依存性腫瘍細胞の増殖物質の特定は、アンドロゲン非依存性細胞に該増殖物質を添加し培養後、増殖した細胞数を MTT 法 [Tanaka, A. et al., Cancer Research, 58, 2053 (1998)]、³H-TdR 取り込み法 [Tanaka, A. et al., Proceeding of National Academy of Science USA, 89, 8928 (1992)] 等で測定することにより行うことができる。

上記の方法により、アンドロゲン非依存性腫瘍が産生するアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質として、アクチビン [Vale, W. et al., Nature, 321, 776 (1986); Ling N., et al., Nature, 321, 779 (1986)] が取得できるが、アクチビンは、公知の遺伝子組換え技術 (モレキュラークローニング 第2版) 等を用いて取得することでも

きる。

2. アンドロゲン非依存性腫瘍の診断薬および治療薬

本発明のアクチビン活性を阻害する物質を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能であるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、蛋白質、ペプチドまたは抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調

製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 μ g/kg～20mg/kgである。

3. アンドロゲン非依存性腫瘍の診断方法

本発明で見出されたアンドロゲン非依存性腫瘍の産生する増殖物質であるアクチビンを検出または定量することは、アンドロゲン非依存性腫瘍の診断に有用である。アクチビンの検出または定量方法としては、抗アクチビン抗体またはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質などを用いた、以下の方法等を用いることができる。

細胞または組織でのアクチビンの検出または定量方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法 (ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (ABC 法、CSA 法等)、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法 [単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、1987 年)、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法 (東京化学同人、1986 年)] などがあげられる。

蛍光抗体法とは、細胞または組織に存在するアクチビンを、抗アクチビン抗体またはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質と反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質でラベルした抗アクチビン抗体に対する抗体あるいは抗フォリスタチン抗体またはそれらの結合断片と反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法 (ELISA) とは、細胞または組織に存在するアクチビンを、抗アクチビン抗体またはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質と反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗アクチビン抗体に対する抗体あるいは抗フォリスタチン抗体またはそれらの結合断片と反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) とは、細胞または組織に存在するアクチビンを、抗アクチビン抗体またはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質と反応させ、さらに放射線標識を施した抗アクチビン抗体に対する抗体あるいは抗フォリスタチン

抗体またはそれらの結合断片と反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、細胞または組織に存在するアクチビンを、抗アクチビン抗体またはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質と反応させ、さらに FITC などの蛍光物質、ヘルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗アクチビン抗体に対する抗体あるいは抗フォリスタチン抗体またはそれらの結合断片と反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

ウェスタンブロッティング法とは、細胞または組織に存在するアクチビンを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] で分画した後、該ゲルを PVDF 膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗アクチビン抗体またはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質を反応させ、さらに FITC などの蛍光物質、ヘルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗アクチビン抗体に対する抗体あるいは抗フォリスタチン抗体またはそれらの結合断片を反応させた後、確認する方法である。

ドットブロッティング法とは、細胞または組織に存在するアクチビンを、ニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗アクチビン抗体またはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質を反応させ、さらに FITC などの蛍光物質、ヘルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した、抗アクチビン抗体に対する抗体あるいは抗フォリスタチン抗体またはそれらの結合断片を反応させた後、確認する方法である。

免疫沈降法とは、細胞または組織に存在するアクチビンを、抗アクチビン抗体またはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質と反応させ、プロテイン G—セファロース等のイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

また、アクチビンをコードする DNA あるいは RNA、またはオリゴヌクレオチドを用いて、ノーザンブロット法 (新細胞工学実験プロトコール 秀潤社 1993 年)、PCR 法 (PCR Protocols, Academic Press, 1990 年)、インサイツハイブリダイゼーション法 (in situ ハイブリダイゼーション手法 学際企画 1992 年) 等の遺伝子工学的手法により、組織または細胞内のアクチビンを検出または定量することができる。

ノーザンブロット法とは、細胞または組織より mRNA あるいは全 RNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動 (モレキュラークローニング 第 2 報) 等で分画した後、該ゲ

ルをニトロセルロース膜等にプロットし、該膜に放射線などの標識を施したアクチビン cDNA の全長あるいは一部をプローブとして反応させた後、オートラジオグラフィ等により、細胞あるいは組織に存在するアクチビンの mRNA を確認する方法である。

PCR 法とは、細胞または組織より mRNA あるいは全 RNA を抽出し、アクチビンの塩基配列に基づいて設計したプライマーおよびポリメラーゼ等を添加し、アクチビン cDNA 断片を増幅し、アガロースゲル電気泳動等で確認する方法である。

インサイツハイブリダイゼーション法とは、細胞または組織に存在するアクチビン mRNA に、ビオチンなどの標識を施したアクチビン cDNA の全長あるいは一部をプローブとして反応させた後、酵素標識したアビジン等を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

さらに、FGF-8 とアクチビンはアンドロゲン非依存性腫瘍に対して付加的増殖促進作用を有しており、さらに、ホルモン依存性腫瘍と非依存性腫瘍が産生する増殖物質が異なることから、アクチビンと FGF-8 とを単独あるいは同時に検出または定量することにより、アンドロゲン依存性腫瘍からアンドロゲン非依存性腫瘍への変換をモニターすることができる。具体的には、細胞または組織に存在するアクチビンまたは FGF-8 を、抗アクチビン抗体あるいはフォリスタチンなどのアクチビン結合蛋白質、および抗 FGF-8 抗体と反応させ、上述した各種免疫学的方法により、検出または定量することにより行うことができる。

または、アクチビンまたは FGF-8 をコードする DNA あるいは RNA、またはオリゴヌクレオチドを用いて、上述の遺伝子工学的手法によっても、アクチビンおよび FGF-8 を単独あるいは同時に検出または定量することができる。

図面の簡単な説明

第 1 図 アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 培養上清のマウス繊維芽細胞 NIH3T3 に対する増殖促進活性を示す。

第 2 図 アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 培養上清をヘパリンセファロースカラムで精製した画分のマウス繊維芽細胞 NIH3T3 に対する増殖促進活性を示す。

第 3 図 ヘパリンカラムで精製した画分および精製アクチビンのマウス繊維芽細胞 NIH3T3 に対する増殖促進活性および各々の増殖促進活性に対するフォリスタチンの

阻害効果を示す。

第4図 Copper-chelating カラムで精製した画分中のアクチビン β Aをウエスタンブロット法により検出した結果を示す。

第5図 精製アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、およびアクチビンAとアクチビンBとの混合物のマウス繊維芽細胞NIH3T3に対する増殖促進活性を示す。

第6図 精製アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、およびアクチビンAとアクチビンBとの混合物のアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 に対する増殖促進活性を示す。

第7図 FGF-8 単独、および FGF-8 存在下における精製アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、およびアクチビンAとアクチビンBとの混合物のアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 に対する増殖促進活性を示す。

第8図 アンドロゲン無刺激マウス乳癌細胞 SC-3 細胞 (レーン1)、アンドロゲン刺激マウス乳癌細胞 SC-3 細胞 (レーン2)、アンドロゲン無刺激マウス乳癌細胞 SC-4 細胞 (レーン3)、アンドロゲン刺激マウス乳癌細胞 SC-4 細胞 (レーン4)、アンドロゲン無刺激マウス乳癌細胞 CAD021 細胞 (レーン5)、アンドロゲン刺激マウス乳癌細胞 CAD021 細胞 (レーン6) の、アクチビン β B、FGF-8 および G3PDH の mRNA を RT-PCR 法により検出した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

1. アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 培養上清中のマウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞に対する増殖促進作用

アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 [Nonomura, N., et al., Cancer Research, 48, 4904 (1988)] およびアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 [Noguchi, S. et al., Journal of Steroid Biochemistry, 32, 479 (1989)] のオートクラインおよびバラクライン増殖因子を取得する目的で、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 の産生する増殖物質を、マウス繊維芽細胞株 NIH3T3 細胞 [Tanaka, A., et al., FEBS Letters, 363, 226 (1995)] の増殖促進活性を指標として、以下のように解析した。バラクライン増殖因子とは、増殖因子を産生する細胞に隣接または近傍の他の形態の細胞に作用する物質である。

0.5×10^6 個のアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 または 0.8×10^6 個のアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 を、デキストランチャーコール処理した牛

胎児血清 (FBS) を 2%含む DMEM:Ham's F-12 (1:1, v/v 日水製薬社製) 培地にそれぞれ懸濁して 100-mm ディッシュに加え、37°C CO₂ インキュベーター中で培養した。翌日、培養培地を FBS を含まない DMEM:Ham's F-12 (1:1, v/v 日水製薬社製) 培地に交換した。さらに 48 時間培養後、培養上清を計 2 リットルずつ回収した。

NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性の評価

NIH3T3 細胞をデキストランチャーコール処理した FBS を 2%含む DMEM:Ham's F-12 (1:1, v/v 日水製薬社製) 培地に懸濁し、96 ウェルプレートの各ウェルに 3×10^3 細胞/100 μ l ずつ加え培養した。翌日、培養培地を除去し、被検サンプルを含む 1%FBS 添加 DMEM:Ham's F-12 (1:1, v/v 日水製薬社製) 培地 100 μ l を加え培養した。さらに 2 日間培養した後に、培養培地を除去し、1%FBS 添加 DMEM:Ham's F-12 (1:1, v/v 日水製薬社製) 培地 100 μ l を加えて培養した。2 日後に文献[Tanaka, A., et al., Cancer Research, 58, 2053 (1998)] に記載の方法に従い、MTT アッセイ系により培養液中の細胞数を測定した。

その結果を第 1 図に示した。被検サンプルとして上記アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 培養上清をそれぞれ 50%、100%添加すると、NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性は $132.5 \pm 11.3\%$ 、 $158.8 \pm 3.1\%$ であった。また、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 培養上清をそれぞれ 50%、100%添加すると、NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性は $156.3 \pm 2.5\%$ 、 $153.1 \pm 2.5\%$ であった。以上より、アンドロゲン非依存性細胞の培養上清には、NIH3T3 細胞に対する増殖促進効果が認められた。

2. アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 培養上清中のマウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性物質の精製

上記 1 に示したアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 の培養上清およびアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 の培養上清を、文献 [Tanaka, A. et al., Proceeding of National Academy of Science USA, 89, 8928 (1992)] に記載の方法に従い、分子量 10 キロダルトン以下の分子を除去する Pellicon-Labocassette (ミリポア社製) を用いて濃縮操作を行った。文献 [Tanaka, A. et al., Proceeding of National Academy of Science USA, 89, 8928 (1992)] に記載の方法に従い、得られた濃縮培養上清を 0.1M NaCl、0.1% CHAPS {3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate 和光純薬工業社製}、2mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド、200 μ g/ml ロイペプチンを含む 10mM Tris/HCl 緩衝液 (pH7.5) (以下、

平衡化緩衝液と記す)で平衡化したヘパリンセファロースカラム(ゲル容積 1ml:アマシヤムファルマシヤバイオテク社製)にのせた。

上記平衡化緩衝液でカラムを洗浄後、NaCl 濃度 0.3M、0.6M、2M を含む平衡化緩衝液を各 10ml ずつカラムに流し、カラム吸着タンパクを 1ml ずつ計 10 本順次溶出した。ヘパリンカラム溶出画分の活性は、上記 1 に示した NIH3T3 細胞を用いた増殖アッセイ系において溶出フラクション(最初の各 5 本)を被検サンプルとして各 2% 添加して検討した。

アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 培養上清を精製した結果を第 2 図に示した。NIH3T3 細胞の増殖促進活性物質は 0.3MNaCl 溶出画分に回収された。アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 培養上清についても、NIH3T3 細胞の増殖促進活性物質は、第 1 表に示したように、0.3MNaCl 溶出画分に回収された。

第 1 表

サンプル	NIH3T3 細胞増殖活性
SC-4 培養上清	+
ヘパリンカラム	
0.3 M NaCl 溶出画分	+
0.6 M NaCl 溶出画分	-
2 M NaCl 溶出画分	-

アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 培養上清については、0.3M NaCl 溶出画分を回収し、上記平衡化緩衝液で平衡化した Copper-chelating カラム(ゲル容量 0.8ml:ファルマシヤ社製)にのせた。平衡化緩衝液でカラムを洗浄後、2 mM、5mM、10mM、20mM イミダゾールを含む平衡化緩衝液を各 5ml ずつカラムに流し、カラムに吸着したタンパク質を順次溶出した。溶出画分の活性は、上記 1 に示した NIH3T3 細胞を用いた増殖アッセイ系において溶出フラクションを被検サンプルとして各 2% 添加して検討した。

その結果を第 2 表に示した。NIH3T3 細胞の増殖促進活性は 10mM イミダゾール溶出画分に回収された。

第 2 表

サンプル	NIH3T3 細胞増殖活性
ヘパリンカラム 0.3M NaCl 溶出画分	+
Copper-chelating カラム	
2mM イミダゾール溶出画分	-
5mM イミダゾール溶出画分	+
10mM イミダゾール溶出画分	-
20mM イミダゾール溶出画分	-

3. アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 培養上清中の NIH3T3 細胞増殖促進活性物質の同定

アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 培養上清中の増殖促進活性物質は上記 2 のヘパリンカラムを用いた精製において 0.3M NaCl で溶出された。通常、FGF ファミリーの増殖因子は、ヘパリンへの親和性が高いが [Burgess, W. H. et al., Annual Review of Biochemistry, 58, 575(1989)]、溶出された増殖促進活性物質はヘパリンへの親和性が非常に弱いことから、FGF ファミリーの増殖因子に属するものではないと考えられた。

さらに、上記活性物質は、繊維芽細胞 NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性を有していることから、TGF (Transforming Growth Factor) - β スーパーファミリーに属する物質と推定された。TGF- β スーパーファミリーの中で内分泌系の臓器での発現が多いアクチビン [Munier, H. et al., Proceeding of National Academy of Science USA, 85, 247-251 (1988)] に注目して以下の解析を行った。

上記 2 で得られた NIH3T3 細胞の増殖を促進する活性を有するアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 培養上清のヘパリンカラムを用いた精製画分を 1% となるように、上記 1 で示した NIH3T3 細胞を用いた増殖アッセイ系に添加し、さらに組換えヒトフォリスタチン [米国 National Hormone & Pituitary Program の Palow 博士よりの供与: Journal of Endocrinology, 154, 535 (1997)] を終濃度 10nM になる

ように添加した。フォリスタチンはアクチビン結合タンパク質であり、アクチビン活性を中和する能力を有している。

その結果を第3図に示した。ヒトフォリスタチンは終濃度 10nM において、NIH3T3 細胞の増殖に対して効果を示さなかったが、ヘパリンカラムを用いて精製された画分の有する NIH3T3 細胞の増殖を促進する活性を阻害する作用を示した。また、陽性コントロールとして用いた精製したウシアクチビン A (β 鎖ホモ二量体: β A β A) [Hasegawa, Y., et al., *Hormone Research*, 41(supplement 1), 55 (1994)] は 10、100ng/ml において NIH3T3 細胞の増殖を促進すること、およびフォリスタチンは 10nM においてアクチビン A の活性を阻害することが確認された。

アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 CAD021 細胞の培養上清中の NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性はフォリスタチンにより阻害されたことから、フォリスタチン結合因子として報告されているアクチビンの存在が示唆された。そこで、上記2で示した、Copper-chelating カラムにより精製した NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性画分のアクチビンの有無を、抗アクチビン β A モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて以下のようにして検討した。

文献 [Tanaka, A., et al., *Cancer Research*, 58, 2053 (1998)] の方法に従い、10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲル (第一化学社製) を用いた SDS-PAGE を以下のようにして行った。

上記2で取得した Copper-chelating カラムで精製した画分の 10 分の 1 量をゲルのレーンにのせた後電気泳動し、泳動後、該ゲルを PVDF 膜 (バイオラッド社製) に転写した。これに 10 万倍希釈の抗アクチビン β A モノクローナル抗体 [Miyamoto, K. et al., *BBRC*, 136, 1103-1109 (1986)] を反応させ、ECL Plus detection kit (アマシャム社製) を用いて添付プロトコールに従い、アクチビン β A を検出した。

その結果を第4図に示した。Copper-chelating カラムで精製した画分中に、抗アクチビン β A モノクローナル抗体に反応する分子量約 14.8 キロダルトン付近のバンドが検出された。また、バンドの移動度は陽性コントロールのヒト組換えインヒビン A [アクチビン β A 鎖 (分子量 18 キロダルトン) とインヒビン α (分子量 18 キロダルトン) のヘテロダイマー] 中のアクチビン β A のバンドと一致した。従って、Copper-chelating カラムで精製した画分中にはアクチビン β A が含まれることが明らかとなった。

アクチビンが NIH3T3 細胞の増殖促進活性物質であることを確認する目的で、精製したウシアクチビン A (β 鎖ホモ二量体: $\beta A \beta A$)、アクチビン B (β 鎖ホモ二量体: $\beta B \beta B$)、アクチビン AB (β 鎖ホモ二量体: $\beta A \beta B$) [Hasegawa, Y., et al., *Hormone Research*, 41(supplement 1), 55 (1994)] および組換えヒトインヒピン A (α 鎖 β 鎖ヘテロ二量体: $\alpha A \beta B$) (米国 National Hormone & Pituitary Program 製) を用いて、上記 1 に示した方法により NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性を検討した。

その結果を第 5 図に示した。3 種の精製アクチビンは、全て濃度依存的に NIH3T3 細胞の増殖促進活性を示した。一方、インヒピン A は NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性を全く示さなかった。従って、NIH3T3 細胞に対する増殖促進活性は、 β 鎖のホモ二量体 ($\beta A \beta A$ 、 $\beta B \beta B$ 、 $\beta A \beta B$) が特異的に有することが明らかとなった。

4. アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 に対するアクチビンの増殖促進効果

アクチビンのアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 の増殖に対する効果について、上記 3 で示した精製したウシアクチビン A、アクチビン B およびアクチビン AB を用いて検討した。

アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 をデキストランチャーコール処理した FBS を 2% 含む DMEM:Ham's F-12 (1:1, v/v 日水製薬社製) 培地で懸濁し、96 ウェルプレート各ウェルに 1.5×10^3 細胞/100 μ l ずつ加え培養した。翌日、培養培地を除去し被検サンプルを含む 0.1%BSA 添加 DMEM:Ham's F-12 (1:1, v/v 日水製薬社製) 培地 100 μ l 加え培養した。2 日後に培養培地を交換し、さらに 1 日間培養した後に文献 [Tanaka, A., et al., *Cancer Research*, 58, 2053 (1998)] に記載の方法に従い MTT アッセイ系により培養液中の細胞数を測定した。

結果を第 6 図に示した。アクチビン B およびアクチビン A とアクチビン B の混合物を 100ng/ml の濃度で添加すると、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 の増殖は無添加に比べて、それぞれ 145%、138% になった。一方、アクチビン A およびアクチビン AB を添加した場合の増殖は無添加に比べて、それぞれ 110%、100% であった。従って、3 種のアクチビンの中でも、アクチビン B のアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 に対する増殖促進活性が最も高いことが明らかとなった。

アンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 Shionogi carcinoma 115 のオートクライン増殖物質として見出された FGF-8 は、アンドロゲン依存性腫瘍の増殖物質として重要で

あると報告されている [Tanaka, A. et al., Proceeding of National Academy of Science USA, 89, 8928 (1992)] が、アンドロゲン非依存性腫瘍での関連については知られていない。そこで、アンドロゲン非依存性細胞の増殖物質である精製アクチビン B の増殖促進活性に及ぼす FGF-8 の効果について、上記に示した方法と同様に検討した。

その結果を第 7 図に示した。精製 FGF-8 [Tanaka, A., et al., FEBS Letters, 363, 226 (1995)] は、50 ng/ml において単独でアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 の増殖を促進する活性を有していた。さらに、アクチビン B およびアクチビン A とアクチビン B との混合物は、100ng/ml の濃度において FGF-8 の有するアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 増殖促進活性をさらに増強する作用を示した。アクチビン A およびアクチビン AB には FGF-8 による増殖促進活性を増強する作用は認められなかった。

以上の結果から、アクチビン B がアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 の増殖促進物質であること、FGF-8 はアンドロゲン依存性細胞増殖活性のみならずアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 に対しても増殖促進活性を有すること、および FGF-8 の有するアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 増殖促進活性はアクチビン B によりさらに増強されることが明らかとなった。

5. RT-PCR 法によるアンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 における FGF-8 およびアクチビン mRNA の検出

アンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 における、FGF-8 およびアクチビンの mRNA の検出および発現変動を、RT-PCR 法により検討した。

アンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 細胞へのアンドロゲン刺激は、文献 [Tanaka, A. et al., Proceeding of National Academy of Science USA, 89, 8928 (1992)] 記載の方法に従い行った。細胞からの全 RNA の調製および RT-PCR 法は、文献 [Tanaka, A., et al., FEBS Letters, 363, 226 (1995)] 記載の方法に従い行った。RT-PCR 法は上述の文献記載の方法で 4 8 時間行い、また、用いたプライマーは、マウスアクチビン β B 検出プライマーセットとして、配列番号 1 および 2 記載の合成 DNA、マウス FGF-8 検出用

プライマーセットとして、配列番号 3 および 4 記載の合成 DNA をそれぞれ用いた。遺伝子の発現量の検討のために通常用いられるコントロール遺伝子であるマウス G3PDH 遺伝子(Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase)検出用プライマーセット(Mouse G3PDH Control Amplimer Set) はクローンテック社より購入した。

その結果を第 8 図に示した。コントロール遺伝子 G3PDH の PCR バンドが全て同等であることから、実験に用いたアンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3、アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 の mRNA 量は同等であることが確認された。

アンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 では、アンドロゲン刺激および無刺激に関わらずアクチビン β B鎖 mRNA が検出された。一方、アンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3 ではアンドロゲン刺激および無刺激に関わらずアクチビン β B鎖 mRNA は検出されなかった。FGF-8 mRNA はアンドロゲン刺激したアンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3 のみに検出され、アンドロゲン無刺激アンドロゲン依存性マウス乳癌細胞 SC-3 およびアンドロゲン非依存性マウス乳癌細胞 SC-4 および CAD021 では検出されなかった。

以上の結果から、アンドロゲン依存性腫瘍は、アンドロゲン刺激下で FGF-8 を産生するが、アクチビン β Bを産生しないことが明らかとなった。また、アンドロゲン非依存性腫瘍は FGF-8 を産生しないが、アクチビン β B鎖を産生することが明らかとなった。この結果は、アンドロゲン依存性から非依存性に変換する際に細胞は FGF-8 産生能を失い、アクチビン β B産生能を獲得することを示している。従って、細胞の FGF-8 およびアクチビン β B鎖の産生能を検出することにより、アンドロゲン依存性細胞から非依存性細胞への変換を診断することができる。

産業上の利用可能性

本発明によりアンドロゲン非依存性腫瘍の治療および診断に有用なアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤、アンドロゲン非依存性腫瘍の治療薬および診断薬、アンドロゲン非依存性腫瘍の診断方法、アンドロゲン非依存性腫瘍細胞の増殖抑制物質のスクリーニング方法が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号 1－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 2－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 3 ー人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 4 ー人工配列の説明：合成 DNA

請求の範囲

1. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質を有効成分として含有する、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。
2. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、アクチビン阻害活性を有する物質および線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質から選ばれる少なくとも1種である、請求項1記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。
3. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、アクチビン阻害活性を有する物質である、請求項1または2記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。
4. アクチビン阻害活性を有する物質が、抗アクチビン中和抗体、抗アクチビン受容体中和抗体、アクチビン結合蛋白質およびアクチビンのアンチセンス DNA/RNA から選ばれる物質である、請求項2または3記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。
5. アクチビン結合蛋白質が、フォリスタチンである、請求項4記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。
6. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質である、請求項1または2記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。
7. 線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質が、抗 FGF-8 中和抗体、抗 FGF-8 受容体中和抗体および FGF-8 アンチセンス DNA/RNA から選ばれる物質である、請求項2または6記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤。
8. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質を有効成分として含有する、アンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。
9. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、アクチビン阻害活性を有する物質および線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質から選ばれる少なくとも1種である、請求項8記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。
10. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、アクチビン阻害活性を有する物質である、請求項8または9記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。
11. アクチビン阻害活性を有する物質が、抗アクチビン中和抗体、抗アクチビン受容体中和抗体、アクチビン結合蛋白質およびアクチビンのアンチセンス DNA/RNA から選ばれる物質である、請求項9または10記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

12. アクチビン結合蛋白質が、フォリスタチンである、請求項 11 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

13. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖を抑制する物質が、線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質である、請求項 8 または 9 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

14. 線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) 阻害活性を有する物質が、抗 FGF-8 中和抗体、抗 FGF-8 受容体中和抗体および FGF-8 アンチセンス DNA/RNA から選ばれる物質である、請求項 7 または 13 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍治療薬。

15. 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質およびアクチビン DNA/RNA から選ばれる物質を用いる、アクチビンの検出方法。

16. アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、請求項 15 記載のアクチビンの検出方法。

17. 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質およびアクチビン DNA/RNA から選ばれる物質を用いる、アクチビンの定量方法。

18. アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、請求項 16 記載のアクチビンの定量方法。

19. 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質、アクチビン DNA/RNA、抗 FGF-8 抗体および FGF-8 DNA/RNA から選ばれる物質を用いる、アンドロゲン非依存性腫瘍の診断方法。

20. アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、請求項 19 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の診断方法。

21. 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質、アクチビン DNA/RNA、抗 FGF-8 抗体および FGF-8 DNA/RNA から選ばれる物質を用いる、アンドロゲン依存性細胞からアンドロゲン非依存性細胞への転換の診断方法。

22. アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、請求項 21 記載の診断方法。

23. 抗アクチビン抗体、アクチビン結合蛋白質、アクチビン DNA/RNA、抗 FGF-8 抗体および FGF-8 DNA/RNA から選ばれる物質を有効成分として含有する、アンドロゲン非依存性腫瘍診断薬。

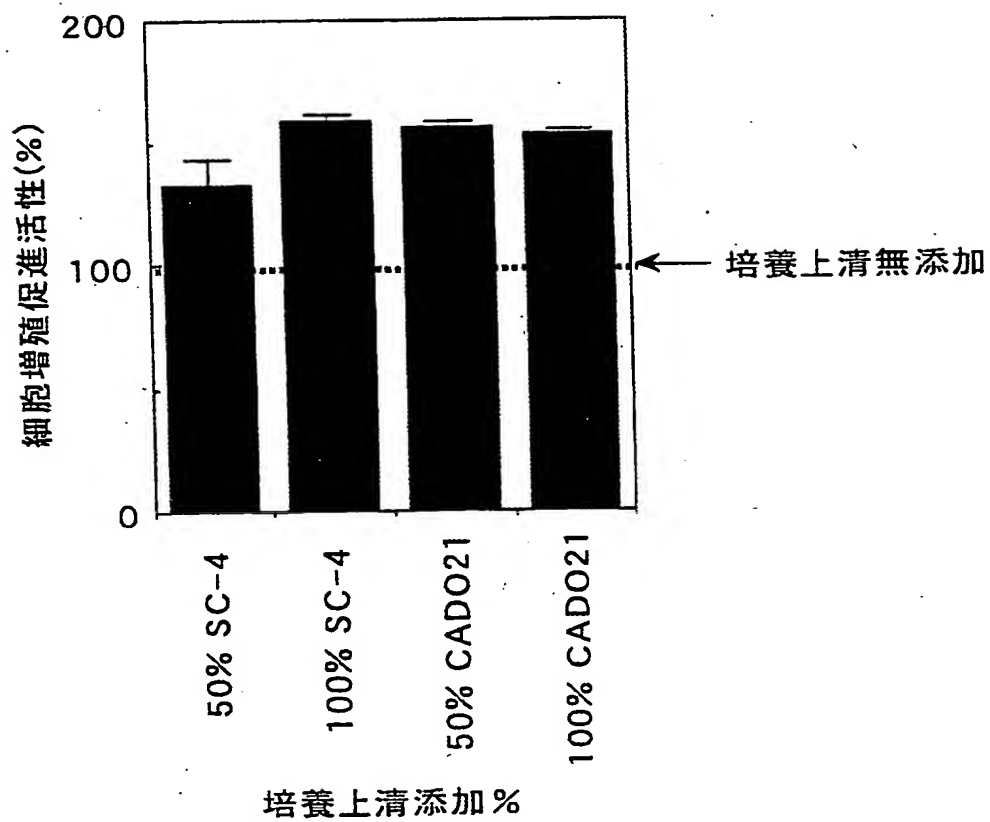
24. アクチビン結合蛋白質がフォリスタチンである、請求項 23 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍診断薬。

25. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質を用いた、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制物質のスクリーニング方法。

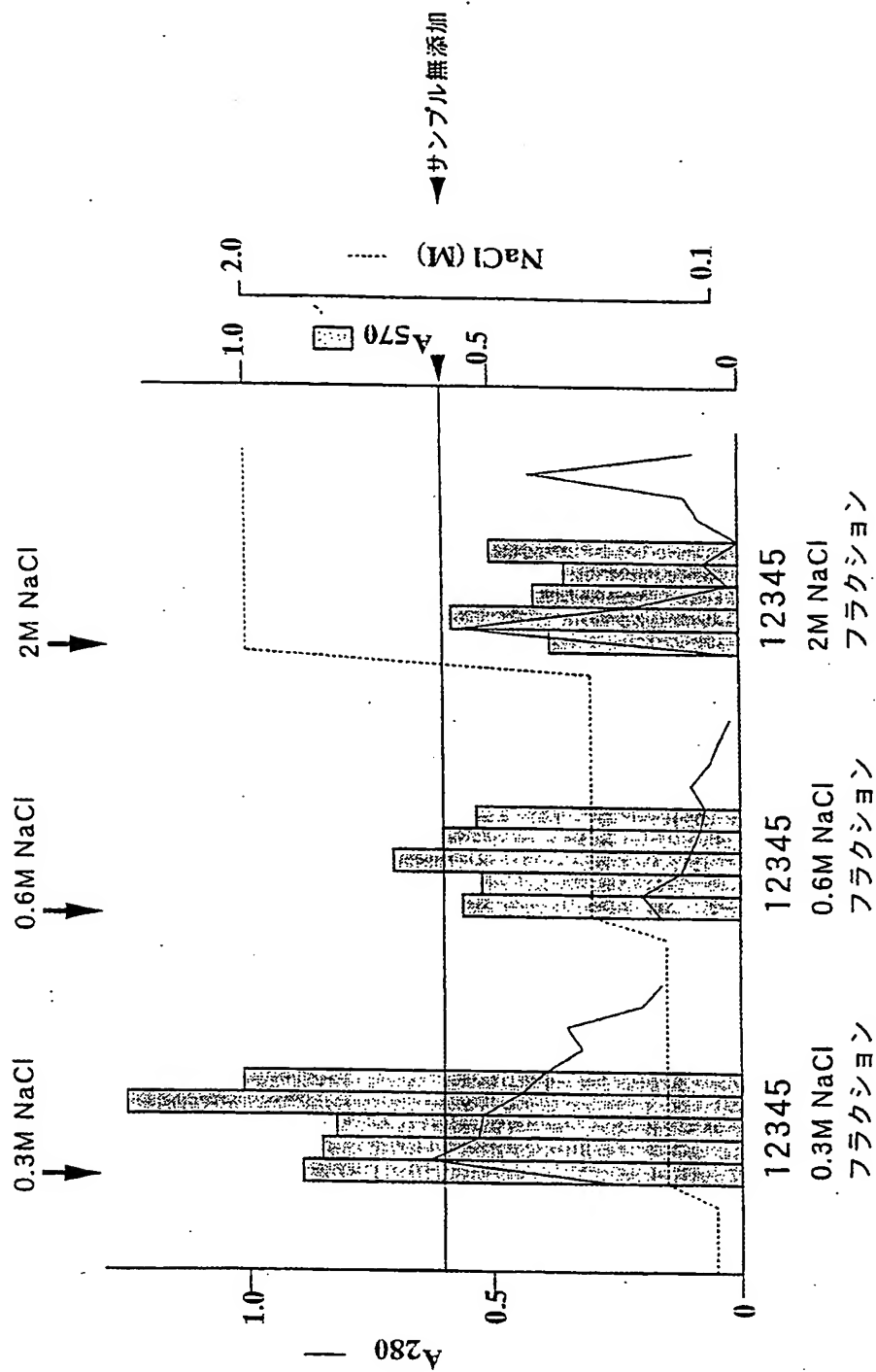
26. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質がアクチビンである、請求項 25 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制物質のスクリーニング方法。

27. アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖物質が線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8) である、請求項 25 記載のアンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制物質のスクリーニング方法。

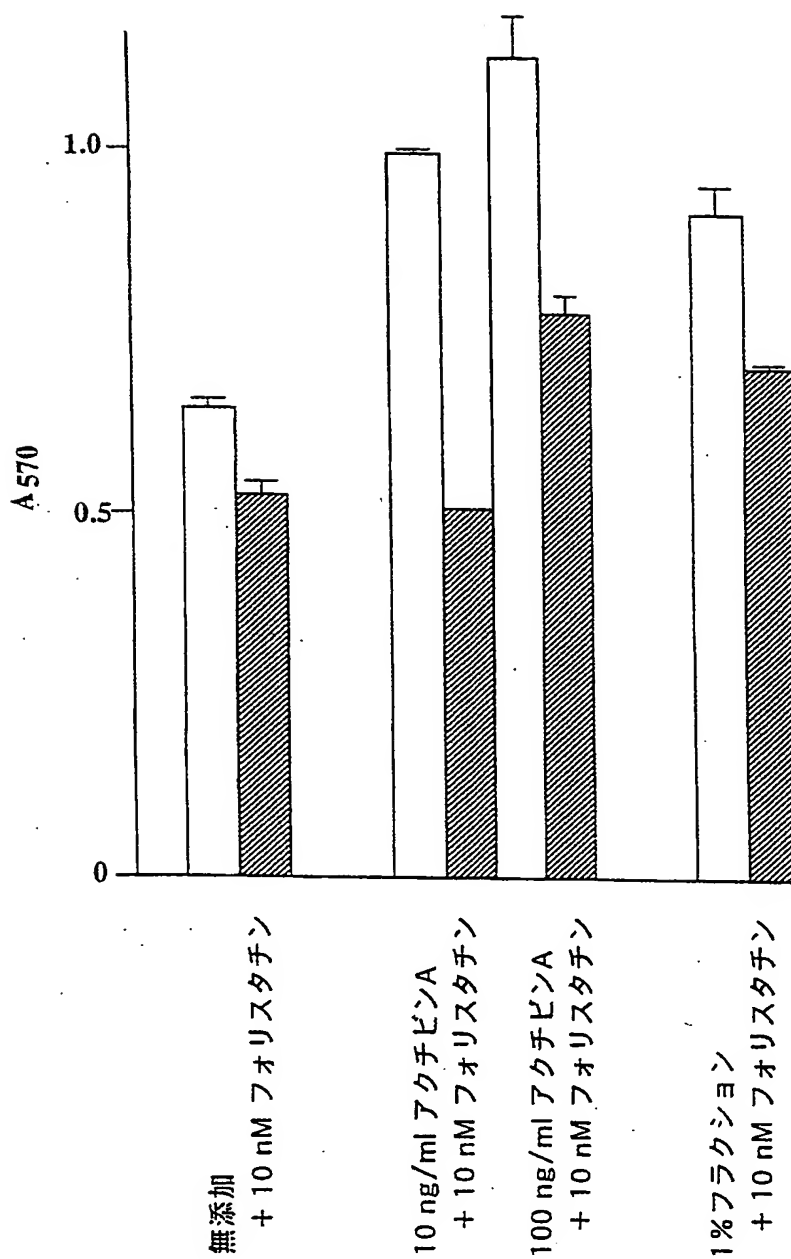
第 1 図



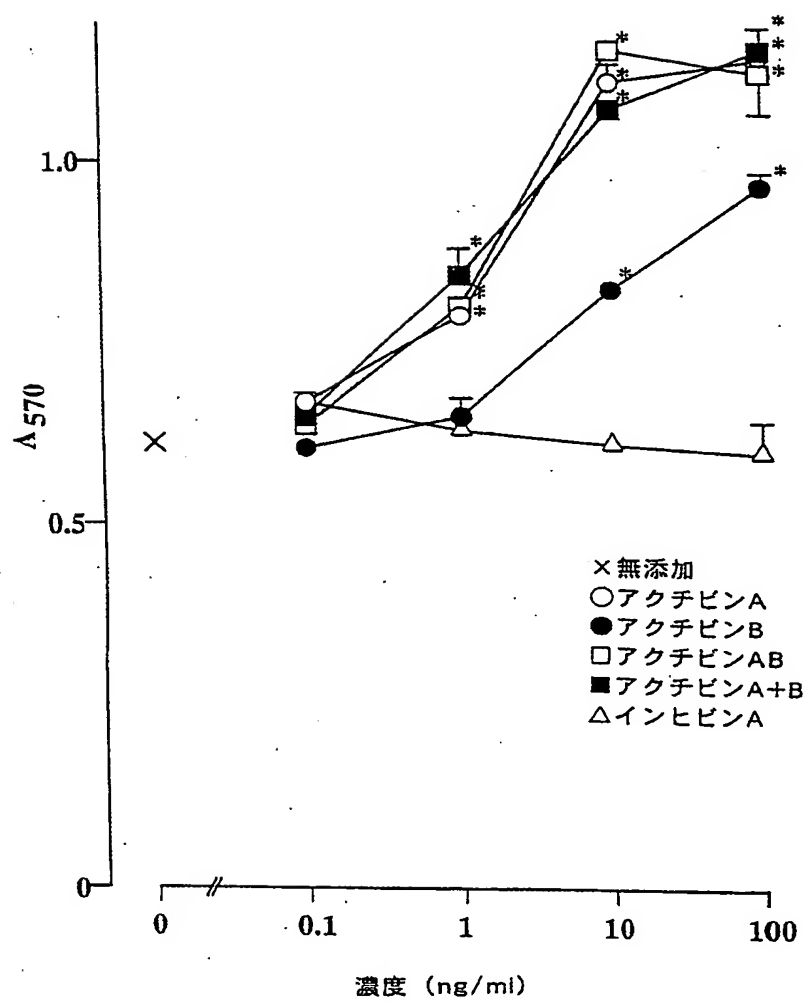
第 2 図



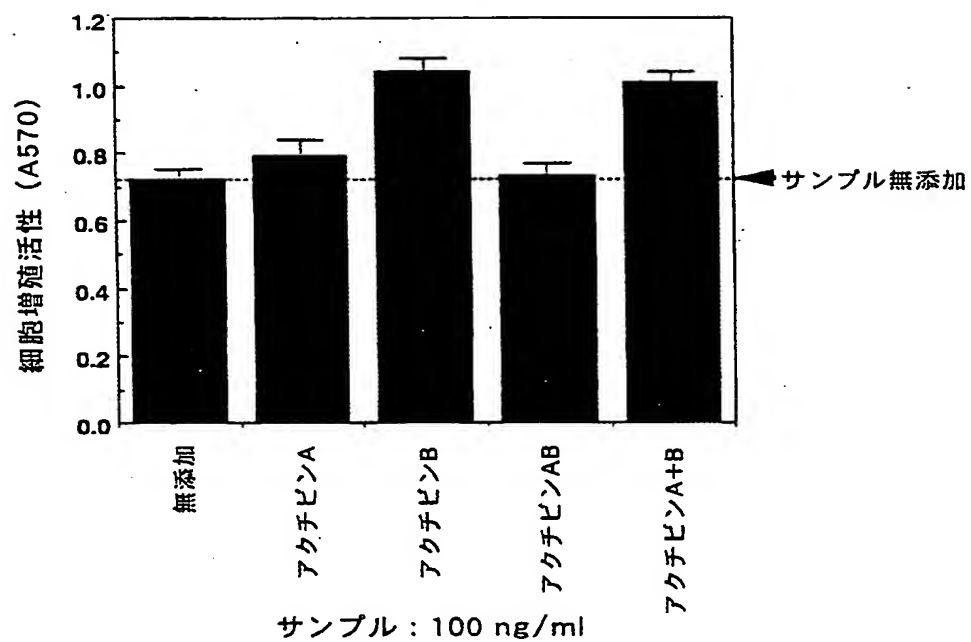
第 3 図



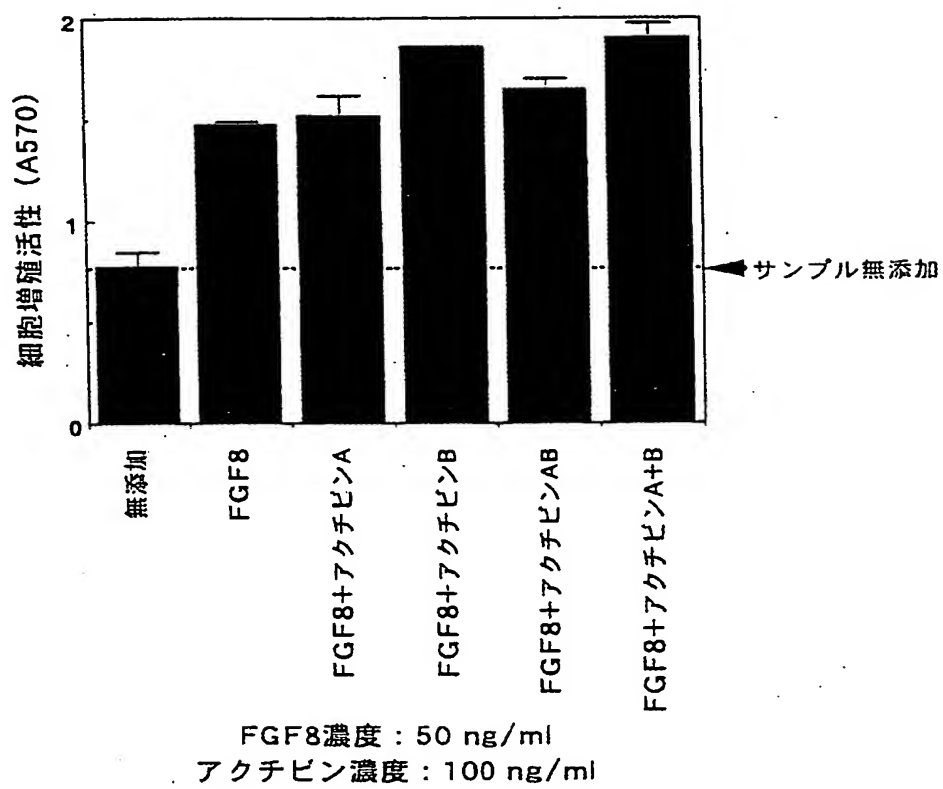
第 5 図



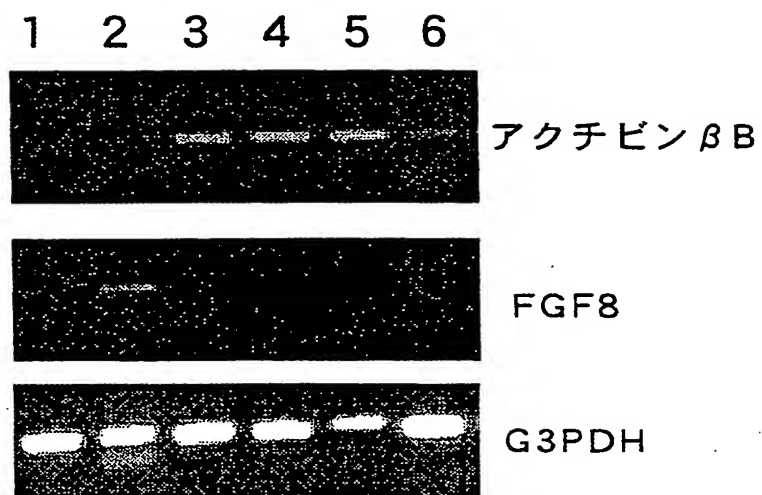
第 6 図



第 7 図



第 8 図



配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., LTD

<120> Growth inhibitor of androgen-independent tumor

<130> 11204W01

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

cgagatcgca tccgcaaacg

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

cactcctcca cgatccatgt t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

tttacacagc atgtgaggga g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

gtagttgagg aactcgaagc g

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/00, 39/395, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P35/00, 43/00,
 C12Q1/68, G01N33/60, 33/15, 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/00, 39/395, 48/00, 31/7105, 31/711, A61P35/00, 43/00,
 C12Q1/68, G01N33/60, 33/15, 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOTECHABS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCPHERSON, S. J. et al, 'Growth inhibitory response to activin A and B by human prostate tumor cell lines, LNCaP and DU145' J. Endocrinol., 1997, Vol.154, No.3, pages 535 to 545	1,8,19-24,25
A		2-7,9-14,26,27
A	SCHMITT, J. F. et al, 'Expression of fibroblast growth factor-8 in adult rat tissues and human prostate carcinoma cells' J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1996, Vol.57, No.3/4, pages 173 to 178	1-14,19-27
A	YING, Shao-Yao et al, 'Expression of activin and activin receptors in PC3 human prostatic cancer cells' Int. J. Oncol., 1995, Vol.6, No.3, pages 601 to 606	1-14,19-27
Y	WO, 94/19455, A1 (Genentech Inc.), 01 September, 1994 (01.09.94), whole document, & EP, 686169, A1 & US, 5563059, A & JP, 8-507211, A	15-18
Y	WO, 94/06456, A1 (Genentech Inc.), 31 March, 1994 (31.03.94),	15-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 17 July, 2000 (17.07.00)

Date of mailing of the international search report
 01 August, 2000 (01.08.00)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02544

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>whole document, & EP, 661993, A1 & US, 5654404, A & JP, 8-501314, A</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02544

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims 1 to 7 pertain to proliferation inhibitors for androgen-independent tumor; inventions as set forth in claims 8 to 14 pertain to remedies for the tumor; inventions as set forth in claims 19 and 20 pertain to methods for the diagnosis of the tumor; inventions as set forth in claims 21 and 22 pertain to methods for the diagnosis of the conversion of androgen-dependent cells into androgen-independent cells; inventions as set forth in claims 23 and 24 pertain to diagnostics for the tumor; and inventions as set forth in claims 25 to 27 pertain to methods for screening the tumor.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02544

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

In contrast thereto, inventions as set forth in claims 15 to 18, which pertain to methods for detecting or quantitating activin, never relate to the above-described androgen-independent tumor or androgen-independent cells, but merely the same antibody, etc. are employed in these methods.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 15 to 18 and inventions of any other group are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Note in International Search Report

Although it is stated in claim 18 "the method for quantitating activin as set forth in claim 16", invention as set forth in the cited claim 16 pertain to not "method for quantitating activin" but "method for detecting activin". Since the citation of claim 16 is seemingly a mistake for the citation of claim 17, this International Search Report has been formed on the assumption that no such mistake arose.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/02544

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K45/00, 38/00, 39/395, 48/00, 31/7105, 31/7111, A61P35/00, 43/00, C12Q1/68, G01N33/60, 33/15, 33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K45/00, 38/00, 39/395, 48/00, 31/7105, 31/7111, A61P35/00, 43/00, C12Q1/68, G01N33/60, 33/15, 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOTECHABS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X / A	MCPHERSON, S. J. et al., 'Growth inhibitory response to activin A and B by human prostate tumor cell lines, LNCaP and DU145' J. Endocrinol., 1997, Vol. 154, No. 3, pages 535 to 545	1, 8, 19-24, 25 / 2-7, 9-14, 26, 27
A	SCHMITT, J. F. et al., 'Expression of fibroblast growth factor-8 in adult rat tissues and human prostate carcinoma cells' J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1996, Vol. 57, No. 3/4, pages 173 to 178	1-14, 19-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 07. 00

国際調査報告の発送日

01.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YING, Shao-Yao et al, 'Expression of activin and activin receptors in PC3 human prostatic cancer cells' Int. J. Oncol., 1995, Vol. 6, No. 3, pages 601 to 606	1-14, 19-27
Y	WO, 94/19455, A1 (Genentech Inc.) 1. 9月. 1994 (01. 09. 94) whole document, & EP, 686169, A1 & US, 5563059, A & JP, 8-507211, A	15-18
Y	WO, 94/06456, A1 (Genentech Inc.) 31. 3月. 1994 (31. 03. 94) whole document, & EP, 661993, A1 & US, 5654404, A & JP, 8-501314, A	15-18

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1乃至7記載の発明は、アンドロゲン非依存性腫瘍の増殖抑制剤に、請求の範囲8乃至14記載の発明は、該腫瘍の治療薬に、請求の範囲19及び20記載の発明は、該腫瘍の診断方法に、請求の範囲21及び22記載の発明は、アンドロゲン依存性細胞からアンドロゲン非依存性細胞への転換の診断方法に、請求項23及び24記載の発明は、該腫瘍の診断薬に、そして、請求の範囲25乃至27記載の発明は、該腫瘍のスクリーニング方法に関するものである。

これに対し、請求の範囲15乃至18記載されたアクチビンの検出方法又は定量方法の発明は、上記アンドロゲン非依存性腫瘍又はアンドロゲン非依存性細胞は、一切関係せず、単に該方法で用いる抗体等が同一のものであるというだけにすぎない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 の続き

したがって、請求の範囲 15 乃至 18 記載の発明と、それ以外のいずれかの請求の範囲記載の発明とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらないこととなる。

国際調査報告の留意点

本願の請求の範囲 18 において、「請求項 16 記載のアクチビンの定量方法」なる記載がなされているが、引用する請求の範囲 16 は、「アクチビンの検出方法」の発明であって、「アクチビンの定量方法」の発明ではない。該請求の範囲 16 の引用は、請求の範囲 17 の引用の誤記と思料される故、当該国際調査報告はそのような誤記がなかったものとして作成した。